

**腺相关病毒载体基因治疗产品非临床研究
技术指导原则**

国家药品监督管理局药品审评中心

2024 年 12 月

目录

一、概述.....	1
(一) 前言	1
(二) 适用范围	1
二、总体考虑.....	2
(一) 研究目的	2
(二) 基本原则	3
1. 具体问题具体分析.....	3
2. GLP 要求	3
3. 随机、对照、重复.....	3
(三) 非临床研究的重要关注点	3
1. 受试物.....	3
2. 动物种属/模型选择.....	4
3. 给药方式/途径.....	6
4. 组织趋向性和体内存续性.....	6
5. 非临床试验的整合设计.....	7
三、基本内容.....	7
(一) 药理学研究	7
(二) 药代动力学研究	7
1. 生物分布.....	7
2. 脱落	9
(三) 非临床安全性研究	9

1. 安全药理学.....	10
2. 一般毒理学.....	10
3. 免疫原性.....	13
4. 遗传毒性.....	13
5. 致癌性.....	14
6. 生殖毒性.....	14
7. 制剂安全性.....	14
8. 其他	15
四、注释.....	15
五、参考文献.....	16

一、概述

（一）前言

体内基因治疗产品一般选用适当的载体或转染方式将外源基因（或基因编辑工具）导入人体，通过替代、补偿、阻断、修正特定基因以达到治疗疾病的目的。腺相关病毒（*adeno-associated virus*, AAV）载体因其理化性质稳定、致病性弱、整合风险低、目的基因表达持久等结构和生物学方面的优势，成为体内基因治疗领域研究和应用最广泛的载体之一。

本指导原则所指 AAV 载体基因治疗产品（以下简称为“AAV 载体产品”）是以 AAV 载体携带含目的基因的基因表达元件，通过目的基因在体内发生转录、翻译，获得目的蛋白并在体内长期表达来发挥治疗作用。该类产品的潜在风险分析时需考虑终产品、所采用的 AAV 载体、递送的目的基因等，还需关注体内长期存续和/或表达带来的长期安全性风险。

为规范和指导 AAV 载体产品的非临床研究和评价，在相关非临床研究指导原则基础上，基于现阶段对于此类产品的科学认知，制定本指导原则，提出非临床研究和评价的要求。

随着技术的发展、认知程度的深入和相关研究数据的积累，本指导原则将不断完善和适时更新。

（二）适用范围

本指导原则中的 AAV 载体是指基于腺相关病毒的结构、理化和生物学特性，经设计和重组改造所形成的用于携带目的基因的病毒载体。本指导原则为此类 AAV 载体产品的非临床研究提供技术指导和建议。

对于携带基因编辑工具的 AAV 载体产品，其作用机制涉及对人体细胞基因组的编辑操作，现阶段对此类产品的认知有限，因此本指导原则不适用于此类产品。

二、总体考虑

（一）研究目的

非临床研究是药物开发的重要组成部分。AAV 载体产品非临床研究的主要目的是：（1）对拟定的作用机制进行概念验证，考察有效性潜力，明确其在拟定患者人群中使用的生物学合理性。通常包括：考察其携带的目的基因能否进入预期的靶细胞并表达为具有生理学功能的蛋白产物、蛋白产物能否对拟定适应症起到治疗作用等。（2）考察 AAV 载体产品在体内的药代特征，评估其生物分布、存续、脱落特征。（3）根据潜在风险因素，阐明毒性反应特征，预测人体可能出现的不良反应，确定临床监测指标，为制定临床风险控制措施提供参考信息。

应通过开展非临床研究，收集用于获益-风险评估的信息，以确定拟开发产品在目标患者人群中预期具有合理的、可接受的获益-风险比，同时为临床试验的设计和风险控制策略的

制定以及产品上市提供支持性依据。

（二）基本原则

1. 具体问题具体分析

由于 AAV 载体产品的生物学复杂性，其非临床研究和评价应遵循“具体问题具体分析”的原则，综合考虑导入的目的基因特性、AAV 载体生物学特征、研究模型的可行性/可获得性、适应症/目标患者群体、给药途径和给药方案等多种因素。

2. GLP 要求

AAV 载体产品的非临床安全性研究一般应当在经过药物非临床研究质量管理规范（GLP）认证的机构开展，并遵守 GLP。当某些特殊情况下无法遵守 GLP 时，例如采用非常规动物模型、在概念验证或生物分布试验中整合安全性检测指标、检测某些特殊指标等，应最大限度地按 GLP 原则进行试验，确保试验质量和数据的完整性及可追溯性。

3. 随机、对照、重复

试验应遵循随机、对照、重复的原则。

（三）非临床研究的重要关注点

1. 受试物

非临床研究所用受试物应能代表临床拟用样品。应明确受试物质量特性。若后续开发阶段药学方面发生变更，需评估变更带来的影响，必要时开展变更前后样品的非临床桥接

研究或开展新的非临床研究。

AAV 载体产品的终产品中，除拟发挥疗效的活性成分外，通常还存在多种相关杂质，如空壳病毒、部分包装病毒、游离衣壳蛋白、游离核酸、DNA 错误包装等。活性成分与相关杂质的含量及比例可能影响 AAV 载体产品发挥药效作用或引起安全性风险的剂量水平，因此，整个非临床和临床开发过程中保持产品特性的一致性对于有效性和安全性至关重要。需要对产品的纯度、杂质进行检测和控制。

当无法采用临床拟用产品进行动物试验而采用携带动物源基因表达元件的替代 AAV 载体产品开展试验时，该替代产品应与临床拟用产品采用相似的生产工艺，并对可能影响有效性和安全性的关键质量参数进行对比研究，以评估替代产品与临床拟用产品的相似性及其对非临床数据预测性的影响。

2. 动物种属/模型选择

应选择相关动物种属/模型进行非临床体内研究。动物种属/模型的选择应具有科学合理的依据。

选择相关动物时需要考虑产品特性和临床拟用情况，包括但不限于以下因素：（1）AAV 载体在动物中的感染敏感性、组织趋向性、转导效率及与人体的相似性；（2）动物对 AAV 载体携带的目的基因的转录和/或表达可行性及其表达产物的生物学效应与预期的人体效应的相似性；（3）动物对 AAV

载体产品的免疫耐受性；（4）动物的解剖学和病理/生理学特征与拟定适应症人群的相似性；（5）临床拟用给药途径、给药方式的可行性。

由于野生型 AAV 的宿主较为广泛，当实验动物体内存在针对野生型 AAV 的预存抗体时，可能会影响 AAV 载体产品给药后的体内暴露，进而影响对有效性和安全性的评价。因此，在动物筛选及分组时需关注预存抗体及其对体内药物暴露的可能影响，尽量选择预存抗体阴性的动物用于试验。

采用疾病动物模型开展的研究可以同时提供 AAV 载体产品的药理活性和毒性信息，也可以模拟临床患者的病理生理状态，因此，必要时可考虑采用疾病动物模型进行非临床安全性研究。

在某些情况下可以考虑使用动物源性替代产品，例如，当来自目的基因的蛋白质由于生物活性的种属差异而不能在动物中发挥其预期作用时，可以使用来自动物的同源基因构建的替代产品。需要注意的是，使用替代产品开展的非临床安全性研究在一定程度上可用于识别风险，但是并不适合用于定量风险评估。

对于拟用于儿科人群的 AAV 载体产品，ICH S11 适用范围不包括基因治疗产品，同时指出基因治疗产品可参考该指导原则关于利用现有信息评估安全性的一些思路，但是，由于 AAV 载体产品的特殊性，应充分评估其在儿科人群中的

潜在风险。对于首次临床试验拟采用儿科人群（例如适应症仅限于儿科人群），考虑进行幼龄动物毒理学试验。若给药可能对儿科人群发育中的器官系统带来较大的安全性风险时，应进行幼龄动物毒理学试验。

3. 给药方式/途径

非临床研究中的给药方式/途径应能最大程度模拟临床拟用给药方式/途径。如果在动物试验中采用其他的给药方式/途径，应阐明其科学性和合理性依据。

4. 组织趋向性和体内存续性

不同血清型 AAV 载体的组织趋向性特征存在差异，然而，这种组织趋向性并不意味着该载体不分布至其他组织器官，因此需通过生物分布研究来考察 AAV 载体产品的靶向和非靶向特征及其风险。另外，AAV 载体的组织趋向性也可能存在种属差异，而 AAV 载体产品在动物与人体之间组织趋向性的差异会影响动物试验对有效性和安全性的预测价值，因此，谨慎将非临床研究中获得的动物数据直接外推至人。

AAV 载体产品携带的目的基因及其表达产物在靶器官/组织中的长期存续性，是该类产品起效的关键决定因素，而 AAV 载体产品及其表达产物在非靶部位的存续则可能带来安全性风险，因此，AAV 载体产品非临床研究时需充分考虑目的基因及其表达产物的存续性。

5. 非临床试验的整合设计

基于 AAV 载体产品的特点、相关动物种属/模型的可获得性，某些非临床试验可整合在其他试验中进行。例如，如果可行且科学合理，在疾病动物模型的药效学试验中伴随考察毒理学指标，将药代动力学试验整合至药效学试验和/或毒理学试验中。整合试验设计有助于阐明药代动力学、药效、毒性的相关性。

三、基本内容

（一）药理学研究

应通过药理学试验阐述 AAV 载体产品的生物学作用和作用机制，提示其在拟定患者人群中使用的生物学合理性。

AAV 载体产品的药理学试验通常包括体外和体内试验。体外试验主要用于评价 AAV 载体产品的转导效率、导入基因的表达情况、表达产物的活性等。体内试验应在与人类疾病相关的疾病动物模型中研究 AAV 载体产品是否可发挥预期的药理学作用，通过对 AAV 载体产品在预期靶器官/组织的分布特征、其携带的目的基因和/或其表达产物在预期靶器官/组织的表达情况、疾病相关指标的改善情况等，来评价产品的有效性潜力。

（二）药代动力学研究

1. 生物分布

AAV 载体产品的生物分布研究信息对提示其有效性和

安全性至关重要。应参考 ICH S12 对基因治疗产品非临床生物分布研究的一般要求，采用相关动物种属开展生物分布试验，以阐明 AAV 载体产品在体内的命运和行为。根据产品特性，检测与药效和毒性相关的药代动力学行为，如 AAV 载体的生物分布、存续和清除特征，携带的目的基因及其表达产物在体内的分布特征等。疾病动物模型可能对评估 AAV 载体产品的分布特征更有意义，鼓励在药效学试验中伴随生物分布研究。

AAV 载体产品生物分布研究应采用合适的剂量，以临床拟用的给药途径，在相关动物种属或动物模型中开展。

需要检测载体水平和目的基因水平。由于 AAV 载体产品最终发挥药理作用的物质为目的基因的表达产物，因此，在方法可行的情况，需要检测表达产物。

采样时间点的选择应足以反映 AAV 载体产品随时间发生改变的特征，至少包括在靶组织和非靶组织的峰值和稳态阶段，并考虑评估长期持续性。

应在每个预设采样时间点评价每种性别（如适用）适当数量的动物，以产生足够的数据来支持全面的生物分布评价。应提供动物数量的科学依据。一般情况下，建议每个性别/组/时间点至少评估 5 只啮齿类动物或 3 只非啮齿类动物。

生物分布研究的检测方法应经过方法学验证。

AAV 载体产品生物分布研究的组织应至少包括给药部

位、性腺（卵巢/睾丸）、肾上腺、脑、脊髓（颈髓、胸髓、腰髓）、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、脾脏、肌肉、血液。另外，需要根据产品特征增加特定的组织器官，例如：AAV 载体的组织趋向性、目的基因的表达产物可能发挥作用的组织；根据给药途径和同类品种信息所提示的潜在毒性靶器官增加其他相关的组织，包括与给药途径相关的淋巴结、给药部位附近的组织[如鞘内注射的脑脊液、脊神经根（包括前根和后根）、背根神经节等]、外周神经、视神经、眼部组织（如眼科用药）等。

此外，免疫原性可能对生物分布产生影响，因此，在生物分布研究时，建议采集样本以备必要时进行免疫原性检测，以支持对生物分布数据的解释。

2. 脱落

脱落是指 AAV 载体通过排泄物（尿液、粪便）、分泌物（唾液等）或其他方式排出体外。应开展 AAV 载体产品的脱落研究。脱落研究可整合至生物分布研究或其他非临床研究中。

（三）非临床安全性研究

在制定非临床安全性研究策略时，应根据 AAV 载体产品本身的特点以及每个产品的特点，按照基于风险的原则具体问题具体分析，总体目的是充分提示产品潜在的安全性风险。

1. 安全药理学

在首次临床试验前,应采用合适的动物种属开展 AAV 载体产品的安全药理学试验,一般包括中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统安全药理学试验。这些试验可整合在一般毒理学试验中进行,若整合进行,需满足安全药理学评价要求,同时检测时间点应符合 AAV 载体产品的特点。若无法进行或不进行,应提供充分的理由。在必要时,可能需要开展补充和追加的安全药理学试验。

对于脑内给药的 AAV 载体产品,需重点关注对神经系统功能的影响,结合药物在脑内不同区域的分布及存续特征,分析对具体神经功能影响的可能性,可单独开展试验评价,也可结合在药效学试验或毒理学试验中设置相应的检测指标。

2. 一般毒理学

一般毒理学试验主要用于评价 AAV 载体产品的全身毒性和局部毒性、急性毒性和长期毒性或延迟毒性、剂量和效应关系等。应基于 AAV 载体产品的生物学特性、可能的风险因素和安全性担忧,采用基于风险、科学导向的灵活设计方案。

2.1 动物种属选择

关于毒理学试验动物种属的选择,应基于动物种属的药理学相关性、相关动物种属/模型的可获得性等因素综合考虑,

总体目标是尽可能最大程度地阐明 AAV 载体产品的安全性特征，为人体安全性提供有价值的预测信息。在可行的情况下，应获得两种相关动物种属（通常包括啮齿类动物和非啮齿类动物）的非临床安全性信息。若仅采用一种相关动物，应提供科学合理的依据。动物种属选择的考虑因素参考本指导原则“二、总体考虑”项下“2.动物种属/模型选择”的建议。

通常采用雌雄两种性别动物进行试验。若采用单性别进行试验，应提供合理性依据。

2.2 分组和剂量设计

通常情况下，一般毒理学试验中的给药剂量应包括多个剂量。合适的剂量间距，有助于评估毒性反应-剂量关系的陡峭程度和 I 期临床剂量递增方案的设计。低剂量一般对应于预期的有效剂量。高剂量一般为了产生毒性反应或提供足够的安全窗，高剂量的设置可能会受到动物模型、给药部位容量/大小、给药途径和制剂最高浓度等限制，可选择最大可行剂量作为高剂量。

需结合处方组成和生产工艺，设置合适的对照组（例如溶媒、辅料、空载体、含有非功能基因的载体等对照组），以帮助确定试验中发现的不良结果是否与受试物相关。当使用疾病动物模型作为实验系统时，应考虑设计模型对照组。

2.3 给药方案和观察期限

试验中的给药方案应最大程度地模拟临床拟用给药方案，给药途径应能反映临床使用情况。

毒理学试验的给药次数一般基于拟定的临床给药次数而设计。AAV 载体产品临床上通常为单次给药，在体内长期存续发挥作用，因此，一般毒理学试验通常采用单次给药，根据产品的作用特点（如载体在体内存续时间、目的基因及其表达产物表达的相关信息等），确定总观察期限。需阐述观察期限设计的合理性。通常一般毒理学试验的总观察期限不短于 6 个月，更长的观察期限更有利于观察长期毒性或延迟毒性（注释 1）。

一般毒理学试验应包括多个解剖时间点（注释 2），以评估可能的急性毒性及其恢复情况、长期存续导致的长期毒性或延迟毒性，并评价产品发挥作用的持续性，以及剂量/暴露量与毒性反应、生物分布与毒性反应的关系。

2.4 检测指标

除一般毒理学试验的常规观察指标外，需结合 AAV 载体产品特性，增加合适的观察指标，如免疫原性、免疫毒性、脑内给药的神经毒性、眼内给药的眼毒性，以及基于同类品种发现的值得关注的安全性信号，在一般毒理学试验中设置特异性的毒性检测指标，并采用敏感的检测方法。应设置合适的时间点以能敏感地检测到对相关指标的影响。

在一般毒理学试验中需伴随进行毒代研究，考察 AAV 载

体产品中载体和目的基因在体内的转录/翻译、分布、存续情况，为毒性试验的结果解释提供支持性数据（必要时设置卫星组），还可伴随开展脱落研究。

3. 免疫原性

影响药物免疫原性的因素复杂，对于 AAV 载体产品，机体可能存在对于野生型 AAV 的免疫记忆、AAV 载体诱导的先天性免疫和适应性免疫、表达产物诱导的免疫反应，因此，AAV 载体产品更容易引起免疫原性，应采用合适的方法开展免疫原性研究，包括对 AAV 载体和表达产物的免疫原性。

实验动物体内的预存抗体可能会影响 AAV 载体产品的体内暴露，进而对有效性和安全性评价产生影响。如果试验中纳入少量预存抗体滴度低的动物时，应评估预存抗体对试验结果的影响。

4. 遗传毒性

通常标准的遗传毒性组合试验不适用于 AAV 载体产品的遗传毒性评价。

通常认为野生型 AAV 主动整合至宿主基因组中的概率低，但是与野生型 AAV 相比，AAV 载体产品的基因组整合特性可能会发生改变。若 AAV 载体产品整合至宿主基因组中，可能会导致宿主遗传物质改变和后续不良生物学效应。因此，应进行基因组整合分析，当存在整合至宿主基因组中的可能性时，需分析基因组整合位点及可能带来的安全性风

险。

5. 致癌性

标准的啮齿类动物致癌性试验一般不适用于评价 AAV 载体产品。可采用证据权重（Weight of Evidence, WoE）方法来评估致癌性风险，必要时进行致癌性相关研究。WoE 评估因素一般包括但不限于：（1）导入的目的基因和药理作用通路与肿瘤发生发展的相关性；（2）潜在的基因组整合风险、基因组整合分析数据；（3）一般毒理学试验中癌前病变或肿瘤发生相关的组织病理学发现；（4）生产体系中可能存在的潜在致癌成分；（5）其他可能与人体内肿瘤发生相关的因素。

6. 生殖毒性

AAV 载体产品应根据产品特性、作用机制、临床适应症和拟用人群、一般毒理学试验中的发现、生物分布和脱落特征等信息评估潜在的生殖和发育毒性风险。生殖毒性试验的研究策略和风险评估可参考相关指导原则。

AAV 载体产品需关注生殖系传递风险。当 AAV 载体产品在性腺持续存在时，需要进一步研究其在生殖细胞（例如卵母细胞、精子）的暴露水平，如有暴露，开展生殖系传递试验。

7. 制剂安全性

应根据 AAV 载体产品的特点和临床应用情况考虑开展终产品制剂的刺激性和溶血性试验。

8. 其他

应基于产品特性及风险，考虑开展必要的其他试验。

四、注释

注释 1: AAV 载体产品一般毒理学试验的观察期限如何设置，尚需不断积累经验。基于产品设计原理，此类产品通常在体内长期存续发挥作用，一般毒理学试验需要考察长期毒性或延迟毒性，因此，建议根据产品的作用特点（如载体在体内存续时间、目的基因及其表达产物表达的相关信息等），确定总观察期限。基于当前认知，建议一般毒理学试验的总观察期限不短于 6 个月，但是在可行的情况下或者是为了考察特殊的毒性特征，更长的观察期限更有利于观察长期毒性或延迟毒性。

另外，基于同类产品的毒理学信息或受试物前期已有的毒理学试验结果提示具有特殊的毒性风险，而需要考察受试物的该毒性风险是否进展或是否能逐渐恢复时，需考虑进行更长期限的观察。

注释 2: 关于 AAV 载体产品一般毒理学试验的解剖时间点的设计，考虑到该类产品通常在体内长期存续发挥作用，需要通过多个解剖时间点来考察药物引起的毒性反应特征（例如急性毒性、长期毒性或延迟毒性、毒性可逆性等），但是，在一项试验中不一定需要或能够包括所有解剖时间点，可以在不同观察期限试验中涵盖这些时间点。

对其具体时间点的设置，尚需不断积累经验。通常应根据 AAV 载体及其表达产物的生物分布特征，选取解剖时间点，例如包括导入目的基因及其表达产物峰值时间点、稳态时间点，更长观察期限的一般毒理学试验中还应包括评估长期持续性及长期毒性或延迟毒性的时间点。

此外，某些情况下，药物在组织或器官的暴露量高低与导致该组织或器官出现明显毒性反应的时间点可能不一致，因此需基于所要考察的预期毒性反应的特点设置合适的解剖时间点。

五、参考文献

- [1] NMPA.基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则(试行).2021.
- [2] NMPA.重组腺相关病毒载体类体内基因治疗产品临床试验申请药学研究与评价技术指导原则.2024.
- [3] FDA. Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products.2013.
- [4] FDA. Design and analysis of shedding studies for virus or bacteria-Based gene therapy and oncolytic products.2015.
- [5] FDA. Recommendations for microbial vectors used for gene therapy.2016.
- [6] EMA. Guideline on non-clinical testing inadvertent germline transmission gene transfer vectors.2007.
- [7] EMA. Guideline on the quality, non-clinical and clinical

aspects of gene therapy medicinal products. 2018.

[8] ICH S12: Nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products.2023.

[9] ICH S11: Nonclinical safety testing in support of development of paediatric medicines.2020.